

平成 21 年 6 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591190

研究課題名（和文） *Chlamydia pneumoniae* 慢性感染症に関する研究研究課題名（英文） Chronic infection with *Chlamydia pneumoniae*

研究代表者

宮下 修行 (MIYASHITA NAOYUKI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50278917

研究成果の概要：*Chlamydia pneumoniae* 慢性・持続感染の引き起こす病態を明らかとするためには、急性株と慢性株をゲノムタイピングし区別することが必要である。そのため単クローンを精製する目的でプラークの作成を試みた。その結果、世界で初めて *C. pneumoniae* のプラーク形成に成功し、クローンを精製することを可能にした。純化した菌株を使用し、*C. pneumoniae* に特異的な配列部分を解析したところ各株をグループ化することに成功した。しかし、現時点では正確に鑑別できる部位を特定できておらず、今後は異なったゲノム領域の解析を行っていく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：クラミジア、慢性持続感染、プラーク、クローニング、ゲノムタイピング

1. 研究開始当初の背景

(1) *Chlamydia pneumoniae* は呼吸器感染症の重要な原因菌の1つで、本邦でも肺炎や気管支炎、喘息・COPDの急性増悪など様々な呼吸器疾患に関与し頻度の高い病原体である。

(2) 本邦での *C. pneumoniae* 抗体保有率は若年成人で60%と高率で、感染機会が非常に多い微生物で再感染もしばしば経験する。しかし、症状が軽微であることから普通感冒と

して取り扱われ、感染が成立しても抗クラミジア薬は使用されず、一部の症例において除菌されないまま慢性・持続感染を起こしていることが判明している。

(3) 慢性・持続感染による慢性的な刺激や免疫反応が気道など感染局所で炎症を引き起こし、喘息や動脈硬化症、多発性硬化症など様々な慢性炎症性疾患を引き起こす可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

(1) 気管支喘息や動脈硬化症をはじめ様々な慢性炎症性疾患の発症や増悪に *C. pneumoniae* の関与が明となれば、クラミジアを除菌することにより発症や増悪予防を可能に出来る。

(2) *C. pneumoniae* 慢性・持続感染の引き起こす病態を明らかとし、慢性・持続感染症の診断法を確立する。

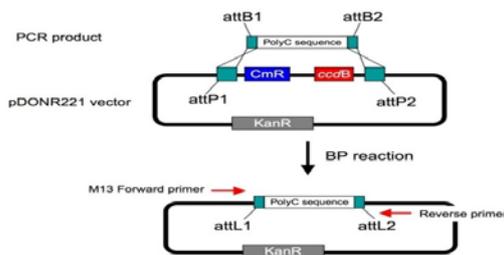
3. 研究の方法

(1) それぞれの菌株に複数のクローンが存在する可能性があり、単クローンを精製する目的でプラークの作成を行った。

(2) *C. pneumoniae* のうち、現在全ゲノムの塩基配列が公開されている4菌株間で塩基配列が異なる領域を検索し (DNAの10塩基以上長さが異なる領域)、その結果 poly C を含む 50~60 塩基からなる特有の配列を示す *C. pneumoniae* polymorphic protein (*ppp*) に注目し解析を行った。

(3) 本邦分離株 (J183 株) を使用してプラークを作成し、初代~3 継代したものから、それぞれ3つのプラークを選定し遺伝子増幅を施行。増幅産物からDNAを抽出し、大腸菌のプラスミドに組み込み、50コロニーずつ選択し増幅産物のシーケンスを行った (図1)。

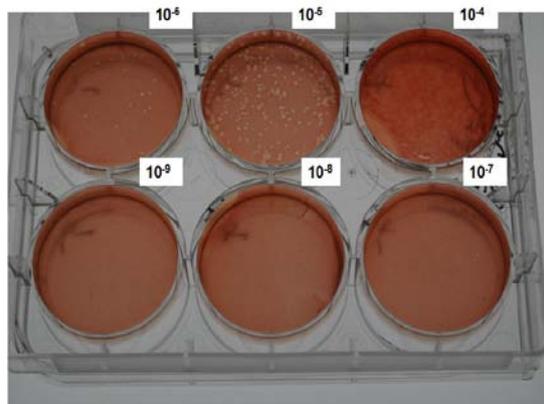
図1. *ppp* 領域の形質転換とシーケンス (Gateway cloning system)



4. 研究成果

(1) 6穴マルチウエルプレートの HEp-2 細胞に菌株を感染後に、1.1%寒天を重層し、さらに培養液を重層して 30°C、5%CO₂ で培養を行った。感染後4日目に寒天上の培養液を入れ替え、11日目に0.03%ニュートラルレッドと1.1%アガロースを含む培養液を上乗せした。これら特殊条件下で12日間培養後、世界で初めて *C. pneumoniae* プラークの形成に成功し、クローンを精製することが可能になった (図2)。

図2. 各希釈系列でのプラーク形成。プラークは希釈系列で 10⁻⁴ から 10⁻⁹ まで認められた。



(2) *ppp* 領域の配列をシーケンス法で比較検討した結果、各国株はすべて区別でき、日本の株はほぼ地域ごとに区別することに成功した。また、同一株の流行と考えられていた集団発生の株が複数のグループに分かれることも判明した。このように各株をグループ化することに成功したが、逆に領域 *ppp7* は再現性が悪いことも判明した。

(3) 領域 *ppp7* のシトシン数は多様で、増幅のたびに異なる数のクローンが現れ、タイピングには不適切であった (図3, 4, 5)。

図3. J183 株由来 PCR クローンの polyC 領域の多型。各精製クローンで 12~17 のシトシン数がみられる。

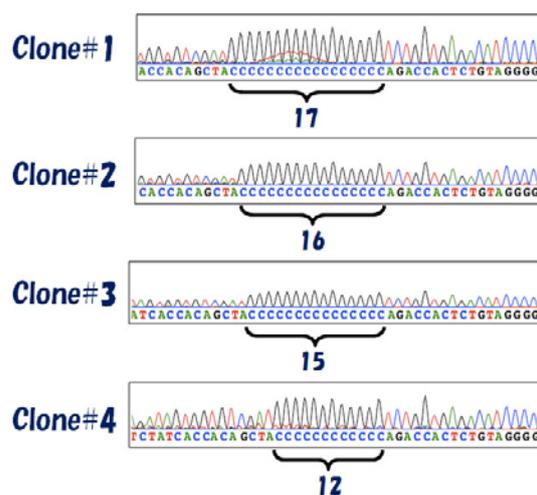


図4. プラーク第1世代の領域領域 *ppp7* のシトシン数。

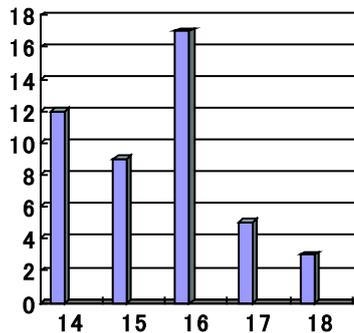
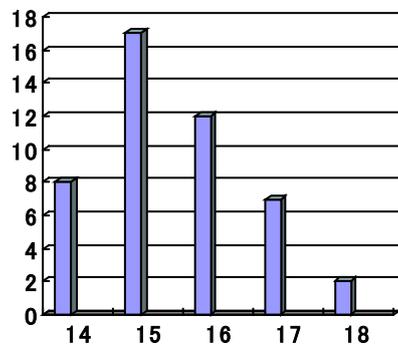


図5. プラーク第3世代の領域領域 *ppp7* のシトシン数。



(4) 今後は異なったゲノム領域の解析も行い、さらにプラーククロニングによる急性株と持続感染株の比較解析も行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 57 件)

- ① Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 6 番目) Radiographic features of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: differential diagnosis and performance timing. BMC Med Imaging 9, 7, 2009. 査読有
- ② Kawai Y, Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 2 番目, 9 番目) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Chlamydia pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009. (in press) 査読有

- ③ Miyashita N, Ouchi K. (他 7 名, 1 番目, 2 番目) Rapid and simple diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia by an immunochromatographic test for detection of immunoglobulin M antibodies. Clin Vaccine Immunol 15: 1128-1131, 2008. 査読有
- ④ Miyashita N, Ouchi K. (他 7 名, 1 番目, 2 番目) Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. Respirology 13: 427-431, 2008. 査読有
- ⑤ Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 2 番目) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin M in acute respiratory tract infection. Respirology 13: 299-302, 2008. 査読有

[学会発表] (計 42 件)

- ① Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 2 番目) Rapid diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia by using an immunochromatographic test for the detection of immunoglobulin M antibodies. 6th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, 2008 年 7 月 1 日, Denmark.
- ② Miyashita N, Ouchi K. (他 8 名, 1 番目, 9 番目) Plaque formation of *Chlamydia pneumoniae*. 6th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, 2008 年 7 月 1 日, Denmark.
- ③ Miyashita N, Ouchi K. (他 6 名, 1 番目, 2 番目) Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, 12th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology/2nd Joint Congress of the APSR/ACCP, 2007 年 12 月 1 日, Australia.
- ④ Miyashita N, Ouchi K. (他 8 名, 1 番目, 9 番目) Clinical features of severe *Mycoplasma pneumoniae* in adults admitted to an intensive care unit, 12th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology/2nd Joint Congress of the APSR/ACCP, 2007 年 12 月 1 日, Australia.
- ⑤ Kawai Y, Ouchi K, Miyashita N. (他 4 名, 2 番目, 5 番目) Establishment of a lamp for rapid diagnostic method of

Chlamydia pneumoniae, 5th World
Congress of the World Society for
Pediatric Infectious Diseases, 2007 年
11 月 17 日, Thailand.

〔図書〕(計 28 件)

- ① 宮下修行：クラミドフィラ肺炎の臨床診断．肺炎の画像診断と最新の診療，藤田次郎 編，210-217，医薬ジャーナル社，2008
- ② 宮下修行，杉生忠昭，清水大樹，岡三喜男：マイコプラズマ・クラミジア．感染症内科クリニカルスタンダード，前崎繁文 編，196-198，文光堂，2008
- ③ 宮下修行：クラミジア・ニューモニエ．KEY WORD 感染症第 2 版，山口恵三，戸塚恭一 編，48-49，先端医学社，2008
- ④ 宮下修行，岡三喜男：クラミジア肺炎．呼吸器専門医テキスト，工藤翔二，中田紘一郎，永井厚志，大田健 編，325-327，南江堂，2007
- ⑤ 宮下修行，岡三喜男：クラミジアニューモニエ肺炎．呼吸器疾患最新の治療 2007-2009，工藤翔二，中田紘一郎，貫和敏博 編，229-231，南江堂，2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 修行 (MIYASHITA NAOYUKI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50278917

(2) 研究分担者

尾内 一信 (OUCHI KAZUNOBU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：80351899